

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-246436

(43) 公開日 平成11年(1999) 9月14日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
A 6 1 K 45/00	A E D	A 6 1 K 45/00	A E D
38/00	A B E	C 0 7 C 259/06	
// C 0 7 C 259/06		A 6 1 K 37/02	A B E

審査請求 未請求 請求項の数 5 F D (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願平10-71445	(71) 出願人	000000952 鐘紡株式会社 東京都墨田区墨田五丁目17番4号
(22) 出願日	平成10年(1998) 3月4日	(72) 発明者	松尾 呼野美 岐阜市則武中4丁目15番1のり永荘303号 室 (72) 発明者 山本 実 大阪市都島区都島南通2丁目12番2-707 号 (72) 発明者 池田 昇司 神戸市東灘区西岡本1丁目6番8-402号

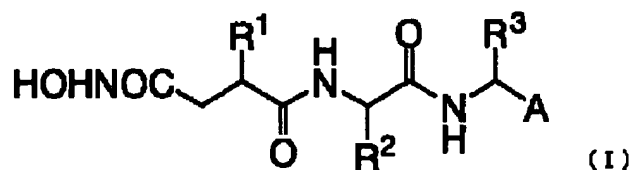
(54) 【発明の名称】 結合組織疾患治療薬およびペプチド誘導体

(57) 【要約】

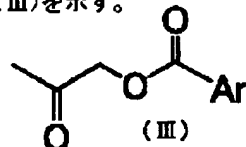
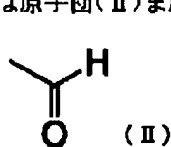
【構成】マトリックスメタロプロテアーゼおよびカテプシンの両酵素に対して阻害活性を有することを特徴とする、結合組織疾患の予防又は治療用薬剤並びに下式

(I)

【化1】



式中、Aは原子団(II)または(III)を示す。



(式中、 R^1 は $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキル基を示し； R^2 および R^3 は官能基が保護されていてもよい天然 α -アミノ酸側鎖または水素原子、 $\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキル基若しくは $\text{C}_6 \sim \text{C}_{12}$ アリール ($\text{C}_1 \sim \text{C}_6$ アルキル) 基を示し；Arは、塩素原子、フッ素原子および／または臭素原子によ

りモノー、ジー、トリー、テトラーまたはペンター置換されていてもよいフェニル基を表わす。) で表される化合物またはその薬学的に許容される塩。

【効果】上記の薬剤は結合組織疾患の予防または治療用薬剤として有用である。

【特許請求の範囲】

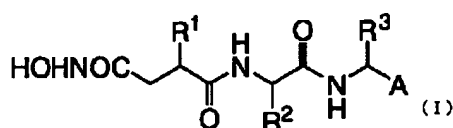
【請求項1】マトリックスメタロプロテアーゼおよびカテプシンの両酵素に対して阻害活性を有することを特徴とする、結合組織疾患の予防又は治療用薬剤。

【請求項2】マトリックスメタロプロテアーゼ阻害薬およびカテプシン阻害薬の二成分を有効成分とする請求項1の薬剤。

【請求項3】マトリックスメタロプロテアーゼおよびカテプシンの両酵素に対して阻害活性を有する化合物を有効成分とする、請求項1の薬剤。

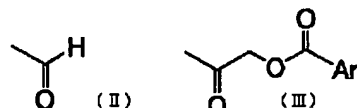
【請求項4】マトリックスメタロプロテアーゼおよびカテプシンの両酵素に対して阻害活性を有する化合物が、下記一般式（I）

【化1】



（式中、Aは下式（II）、（III）

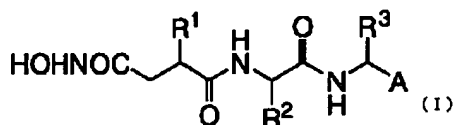
【化2】



で示されるいずれかの原子団を示し；R¹はC₁～C₆アルキル基を示し；R²およびR³は官能基が保護されていてもよい天然α-アミノ酸側鎖または水素原子、C₁～C₆アルキル基若しくはC₆～C₁₂アリール（C₁～C₆アルキル）基を示し；Arは、塩素原子、フッ素原子および/または臭素原子によりモノー、ジー、トリ、テトラまたはペンター置換されていてもよいフェニル基を表わす。）で表される化合物またはその薬学的に許容される塩であるところの請求項3の薬剤。

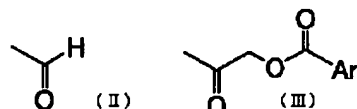
【請求項5】下記一般式（I）

【化3】



（式中、Aは下式（II）、（III）

【化4】



で示されるいずれかの原子団を示し；R¹はC₁～C₆アルキル基を示し；R²およびR³は官能基が保護されていてもよい天然α-アミノ酸側鎖または水素原子、C

₁～C₆アルキル基若しくはC₆～C₁₂アリール（C₁～C₆アルキル）基を示し；Arは、塩素原子、フッ素原子および/または臭素原子によりモノー、ジ、トリ、テトラまたはペンター置換されていてもよいフェニル基を表わす。）で表される化合物またはその薬学的に許容される塩。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】細胞外マトリックスを構成する蛋白成分を分解する酵素として、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）及びカテプシンが知られている。これら酵素の過剰な亢進が変形性関節炎、リウマチ性関節炎、骨粗鬆症などの結合組織の破壊を伴う疾患（結合組織疾患と呼ぶ。）の原因と考えられていることから、それぞれの酵素を阻害する化合物は上記疾患の予防または治療に有効（それぞれMMP阻害薬およびカテプシン阻害薬と呼ぶ。）と考えられている。本発明は、これら両酵素の作用を阻害することを特徴とする、結合組織の破壊を伴う疾患の予防又は治療用薬剤に関する。本発明は、更に、MMPとカテプシンの両酵素に対する阻害作用を併せ持つ化合物に関する。

【0002】

【従来の技術】カテプシンは細胞内リソソームに含まれる蛋白分解酵素の一種であるが、特にカテプシンB及びカテプシンLと呼ばれるシステインプロテアーゼが結合組織の分解に関与していることが知られている〔エセー他、Arthritis & Rheumatism, 37(2), 236(1994)〕。本願明細書においては、特に言及しない限り、結合組織の分解に関与しているこれらシステインプロテアーゼをカテプシンと呼ぶ。

【0003】一方、MMPはZn依存性のメタロプロテアーゼに分類される酵素であり、やはり結合組織の分解に関与していることが知られている。結合組織の分解においてMMPおよびカテプシンがそれぞれ果たしている役割については明らかでないが、カテプシンの酵素活性発現の至適pHがMMPのそれより酸性側であること、MMPが働かない非コラーゲン部分（プロテオグリカン）をカテプシンが分解しうる等からそれぞれが異なった役割を担っていると考えられている〔エバート他、J.Cell.Physiol, 150, 221(1992)〕。従って、結合組織疾患の予防または治療に際しては、これら両酵素を阻害することが好ましい。しかしながら、MMP阻害薬およびカテプシン阻害薬の併用効果について、バトルらの報告〔バトル他、Arthritis & Rheumatism, 36(12), 1709(1993)〕によれば、in vitroの実験において、両阻害薬を併用した場合の効果は各阻害薬単独で使用した場合と比較して有意差が認められず、結合組織疾患に対して両阻害薬を併用することの効果については明らかにされていない。

【0004】MMP阻害薬およびカテプシン阻害薬は既

に多くの化合物が知られている。また、特開平3-86852号公報にはセリンプロテアーゼ、カルボキシプロテアーゼおよびメタロプロテアーゼに対して阻害作用を有するフルオロエチルケトン誘導体が開示されている。しかしながら、メタロプロテアーゼとカテプシンの両酵素に対して阻害作用を有する化合物は知られていない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、MMPおよびカテプシンの両酵素を阻害することの特徴とする、結合組織疾患の予防又は治療用薬剤を提供することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、MMPおよびカテプシンの両酵素を阻害することによって、結合組織疾患の予防または治療において、各酵素の阻害薬を単独で利用した場合と比較してより優れた効果が認められることを見出して本発明を完成した。

【0007】

【発明の実施の形態】本発明の実施の形態のひとつとして、MMP阻害薬およびカテプシン阻害薬の二成分を有効成分として含む薬剤（合剤）を挙げることができる。この形態において使用できるMMP阻害薬としては、例えば下記の公報に記載されたものを例示することができる。

特開平7-101925号

米国特許公報4743587号

国際公開公報WO92/09556号

同公報WO93/09090号

同公報WO93/24449号

同公報WO95/04033号

欧州特許公報489579号

同公報236872号

同公報497192号

同公報575844号

国際公開公報WO90/05719号

同公報WO94/21625号

同公報WO94/24140号

英国公開公報GB2268934号

特開平6-145148号

特開平7-157470号

国際公開公報WO95/47535号

同公報WO97/20824号

同公報WO97/18194号

同公報WO96/33172号

特開平9-188631号

特開平6-256293号

【0008】中でも好ましいのが、下記の化合物である。

[4-(N-ヒドロキシアミノ)-2(R)-イソブチル-3(S)-メチルサクシニル]-L-フェニルグリ

シン-N-メチルアミド(特開平7-101925号)

[4-(N-ヒドロキシアミノ)-2(R)-イソブチル-3-メチルサクシニル]-L-3-(5,6,7,8-テトラヒドロ-1-ナフチル)アラニン-N-メチルアミド(特開平9-188631号)

[4-(N-ヒドロキシアミノ)-2(R)-イソブチル-3(S)-(2-チエニルチオメチル)サクシニル]-L-フェニルアラニン-N-メチルアミド(国際公開公報WO90/05719号)

3(S)-N-ヒドロキシ-4-(4-((ピリド-4-イル)オキシ)ベンゼンスルホニル)-2,2-ジメチル-テトラヒドロ-2H-1,4-チアジン-3-カルボキサミド(国際公開公報WO97/20824号)
N²-[3(S)-ヒドロキシ-4-(N-ヒドロキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-tert-ロイシン-N¹-メチルアミド(英国公開公報GB2268934号)

更に本形態において、MMP阻害薬と併せて使用できるカテプシン阻害薬としては、例えば下記の文献又は特許公報に記載されたものを例示することができる。

特開昭55-153778号

特開昭63-253061号

特開平2-268145号

特開平5-178758号

特開平5-345754号

特開平5-230004号

特開平5-246968号

Arthritis & Rheumatism, 37(2), 236(1994)

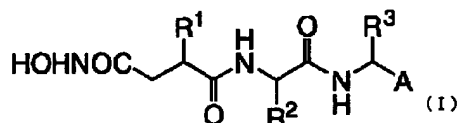
中でも好ましいのが、下記の化合物(E-64)である。

【0009】L-trans-エポキシサクシニル-ロイシンアミド(4-グアニジノ)ブタン(特開昭55-153778号)

また本発明の異なる実施の形態として、下記一般式(I)

【0010】

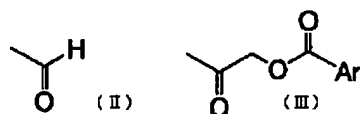
【化5】



(式中、Aは下式(II)または(III))

【0011】

【化6】



で示されるいずれかの原子団を示し; R¹はC₁~C₆ア

ルキル基を示し； R^2 および R^3 は官能基が保護されていてもよい天然 α -アミノ酸側鎖または水素原子、 $C_1 \sim C_6$ アルキル基若しくは $C_6 \sim C_{12}$ アリール（ $C_1 \sim C_6$ アルキル）基を示し；Arは、塩素原子、フッ素原子および/または臭素原子によりモノー、ジー、トリー、テトラーまたはペンター置換されていてもよいフェニル基を表わす。）で示される化合物またはその薬学的に許容される塩を有効成分とする薬剤を挙げることができる。ここで $C_1 \sim C_6$ アルキル基とは、炭素数1から6の直鎖状または分枝鎖を有するアルキル基を意味し、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、イソブチル基、*sec*-ブチル基、*tert*-ブチル基、*n*-ペンチル基、イソペンチル基、*n*-ヘキシル基、イソヘキシル基などを例示することができる。天然 α -アミノ酸側鎖としては、例えばメチル基（アラニン）、カルボキシメチル基（アスパラギン酸）、カルバモイルメチル基（アスパラギン）、カルボキシエチル基（グルタミン酸）、カルバモイルエチル基（グルタミン）、グアニジノプロピル基（アルギニン）、メルカプトメチル基（システイン）、4-イミダゾイルメチル基（ヒスチジン）、*sec*-ブチル基（イソロイシン）、イソブチル基（ロイシン）、4-アミノブチル基（リシン）、2-メチルチオエチル基（メチオニン）、ヒドロキシメチル基（セリン）、1-ヒドロキシエチル基（トレオニン）、*p*-ヒドロキシベンジル基（チロシン）、イソプロピル基（バリン）、ベンジル基（フェニルアラニン）、3-インドリルメチル基（トリプトファン）などを例示することができる〔対応するアミノ酸を括弧内に示した〕。更に、これら側鎖に存在する水酸基、カルボキシ基、メルカプト基、アミノ基、グアニジノ基等の官能基はペプチド化学で通常使用される保護基〔例えば、泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善（株）発行、1985年参照〕で保護されていてもよい。 $C_6 \sim C_{12}$ アリール基とは、水酸基が置換することのある、芳香族特性を有する炭素数6から12の、単環性または二環性基を意味し、フェニル基、*p*-ヒドロキシフェニル基、1-ナフチル基、2-ナフチル基などを例示することができる。

【0012】一般式（I）で示される化合物には立体異性体を有するものが存在するが、本願明細書においては特に明記しない限り、可能な全ての立体異性体をまたはこれらの混合物を含むものとする。

【0013】具体的には以下のような化合物を例示することができる。

化合物1. [4-(N-ヒドロキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-フェニルアラニル-L-アラニナル

化合物2. [4-(N-ヒドロキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-ロイシル-L-アラニナル

化合物3. [4-(N-ヒドロキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-フェニルアラニル-L-ロイシナル

化合物4. [4-(N-ヒドロキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-フェニルアラニル-グリシナル

化合物5. [4-(N-ヒドロキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-フェニルアラニル-L-アラニル [(2, 6-ジクロロベンゾイル) オキシ] メチルケトン

化合物6. [4-(N-ヒドロキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-フェニルアラニル-グリシル [(2, 6-ジクロロベンゾイル) オキシ] メチルケトン

化合物7. [4-(N-ヒドロキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-1-ナフチルアラニル-グリシル [(2, 6-ジクロロベンゾイル) オキシ] メチルケトン

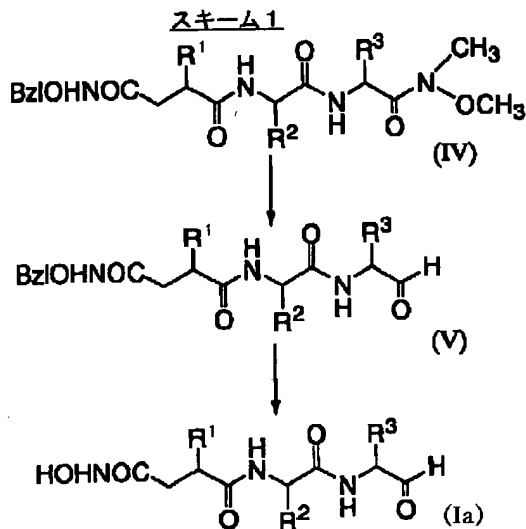
化合物8. [4-(N-ヒドロキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-フェニルアラニル-グリシル [ペンタフルオロベンゾイルオキシ] メチルケトン

化合物9. [4-(N-ヒドロキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-フェニルアラニル-L-アスパラギル [(2, 6-ジクロロベンゾイル) オキシ] メチルケトン

【0014】これらは、カテプシンおよびMMPの両酵素に対して阻害作用を有する化合物であり、例えば以下に示す方法によって製造することができる。尚、以下の反応で使用されるアミノ酸又はペプチドの保護基の種類、導入および脱保護の条件等については、文献〔例えば、泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善（株）発行、1985年〕を参照することができる。一般式（I）で示される化合物のうち、Aが原子団（II）で表される化合物（Ia）は下記スキーム1に従って合成できる。

【0015】

【化7】



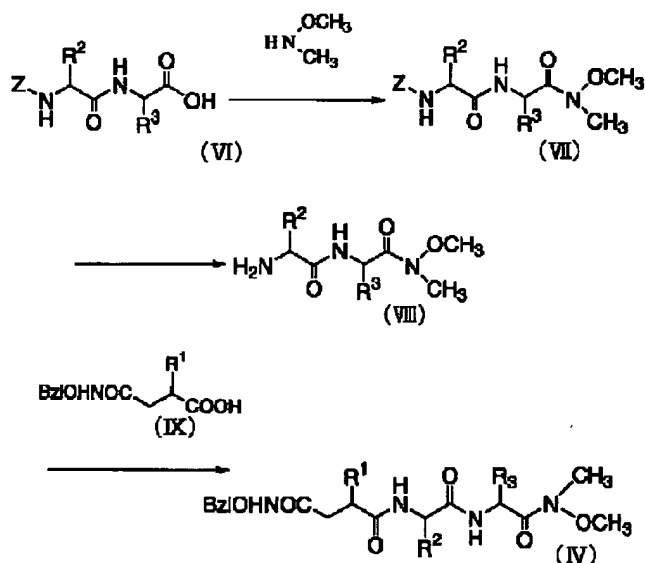
(式中、Bzはベンジル基を示し、 R^1 、 R^2 および R^3 は前記に同じ。)

即ち、化合物 (IV) をテトラヒドロフラン (以下、T

HFと略記する。)、エーテルなどの溶媒中 0.5～5.0モルの水素化リチウムアルミニウムを用いて -10°C ～室温で5分～2時間攪拌することにより化合物 (V) が得られる。次いで、パラジウムカーボン (以下、Pd-Cと略記する。) などの触媒の存在下、水素気流下または加圧下に水素化分解を行うことにより化合物 (Ia) を製造できる。水素化分解は、メタノール、エタノールなどの低級アルコール中、必要ならば水、塩酸、酢酸、N,N-ジメチルホルムアミド (以下、DMFと略記する。) などを加えて行えばよい。尚、 R^2 または R^3 が保護基で保護された天然アミノ酸の側鎖の場合、必要に応じて、最終工程又は上記水素化分解の前に、常法に従って当該保護基の切断除去を行う。以上の方法により得られる本発明化合物 (Ia) は常法によりその薬学的に許容される塩に変換することができる。次に原料化合物の製造方法について述べる。スキーム1の原料化合物 (IV) は以下の方法により製造できる。

【0016】

【化8】



(式中、Zはベンジロキシカルボニル基を示し、 R^1 、 R^2 、 R^3 およびBzは前記に同じ。)

最初に、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (以下、HOBtと略記する。) の存在下縮合剤を用いてジペプチド (VI) とN,O-ジメチルヒドロキシルアミンとを反応させ化合物 (VII) を得る。反応は、DMF、THF、又はジクロロメタン等の非プロトン性溶媒中で、ペプチド合成に用いられる縮合剤、例えばジシクロヘキシルカルボジイミド (以下、DCCと略記する。)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド・塩酸塩 (以下、WSCと略記する。) 等を用い、通常、 0°C ～室温で2～24時間行う。反応に供する化合物のモル比はジペプチド (VI) 1モルに対し

て、通常、N,O-ジメチルヒドロキシルアミン1.0～1.5モル、縮合剤1.0～1.5モル、HOBt 1.0～1.5モルである。次いで、化合物 (VII) のアミノ基の保護基 (Z基) を除去して化合物 (VIII) が得られる。Z基の除去は、ペプチド結合に通常用いられる方法、即ち、水素化分解または臭化水素酢酸溶液等を用いる酸分解により行うことができる。

【0017】次に、化合物 (VIII) と化合物 (IX) を縮合させて化合物 (IV) を得る。縮合反応は、DMF、THF、又はジクロロメタン等の非プロトン性溶媒中で、DCCまたはWSC等を用いて行うことができる。反応は、通常、 0°C ～室温で2～24時間行い、反応に供する化合物のモル比は化合物 (VIII) 1モ

ルに対して、通常、(IX) 1.0～1.5モル、縮合剤1.0～1.5モルである。尚、化合物(IX)は特開平7-101925号公報に記載の方法に準じて製造できる。

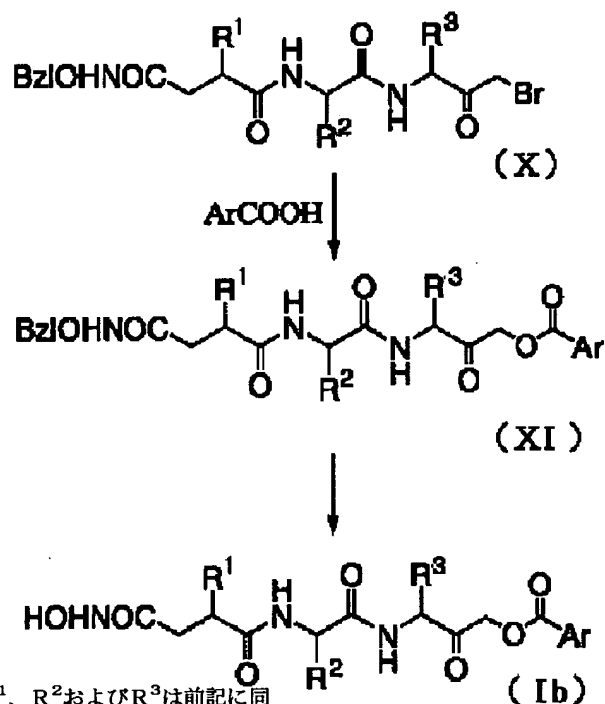
2. 一般式(I)で示される化合物のうちAが原子団

(III)で表される化合物(Ib)は、下記スキーム2に従って合成できる。

【0018】

【化9】

スキーム2

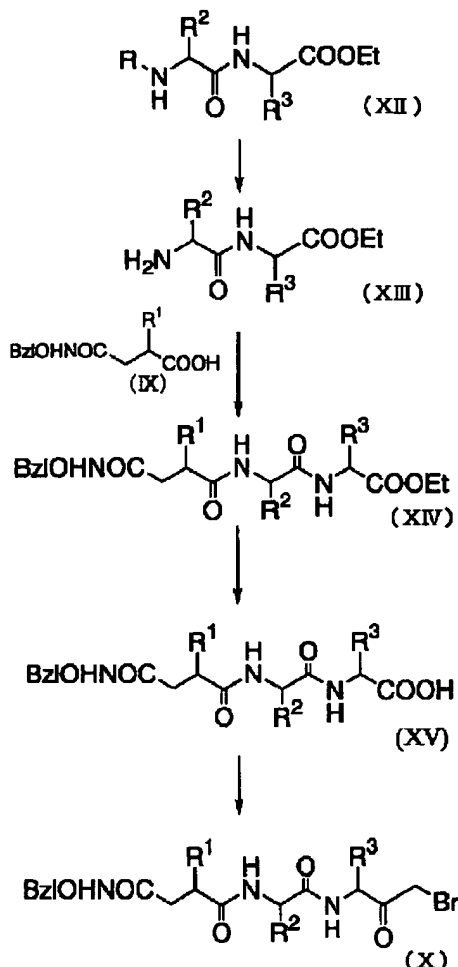


(式中、Ar、Bzl、R¹、R²およびR³は前記に同じ。)

即ち、化合物(X)をDMF、THF、ジオキサン等の溶媒中、フッ化カリウムなどの塩基の存在下、芳香族カルボン酸と室温～60℃で2～24時間攪拌することにより化合物(XI)が得られる。反応に供する化合物のモル比は化合物(X) 1モルに対して、通常、芳香族カルボン酸が1.0～1.5モル、塩基が1.0～5.0モルである。次いで、化合物(XI)を水素化分解することにより化合物(Ib)を製造することができる。水素化分解は前述した方法により行うことができる。尚、R²またはR³が保護基で保護された天然アミノ酸の側鎖の場合、必要に応じて、最終工程又は上記水素化分解の前に、常法に従って当該保護基の切断除去を行う。次に、原料化合物の製造方法について述べる。原料化合物(X)は以下の方法により製造できる。

【0019】

【化10】



(式中、Rはtert-ブトキシカルボニル基またはベンジルオキシカルボニル基を示し、Etは、エチル基を示す。Bz1、R¹、R²およびR³は前記に同じ。)

化合物(XII)のアミノ基の保護基(R)を除去して化合物(XIII)を得る。保護基の除去は、ペプチド合成に通常用いられる方法により行うことができる。即ち、tert-ブトキシカルボニル基の場合にはトリフルオロ酢酸などの酸を用いて、ベンジルオキシカルボニル基の場合には水素化分解あるいは酸分解により行われる。

【0020】次に、化合物(XIII)と化合物(IX)を縮合させて化合物(XIV)を得た後、アルカリ加水分解により化合物(XV)を得る。アルカリ加水分解は、溶媒に水またはジオキサン等を用いて水酸化ナトリウム等のアルカリを加えて1～5時間、0℃～室温で行われる。反応に供するモル比は化合物(XIV)1モルに対してアルカリ1.0～3.0モルである。次いで、THFなどの溶媒中、トリエチルアミン等の塩基の存在下、化合物(XV)にクロロ炭酸エチルエステルなどのクロロホルメートを加えて-10℃～0℃で5～15分間反応した後、ジアゾメタン/エーテル溶液を加えて0℃～室温で5～30分間反応し、次いで臭化水素酢

酸溶液を加えて0℃～室温で5分～1時間攪拌することにより化合物(X)が得られる。反応に供するモル比は化合物(XV)1モルに対して、トリエチルアミンは1.0～1.5モル、クロロ炭酸エチルエステルは1.0～1.5モル、ジアゾメタンと臭化水素は過剰量必要である。

【0021】本発明の薬剤は、経口又は非経口でヒトに投与される。経口投与の剤形としては、錠剤、顆粒剤、散剤、細粒剤、硬カプセル剤等の固形製剤の他、シロップ剤、軟カプセル剤等の液剤が含まれる。かかる製剤は常法によって製造可能であり、錠剤、顆粒剤、散剤又は細粒剤は、MMP阻害薬およびカテプシン阻害薬と、例えば、乳糖、でんぷん、結晶セルロース、ステアリン酸マグネシウム、ヒドロキシプロピルセルロース、タルク等の通常用いられる医薬添加物とを混合して製造され、硬カプセル剤は上記の細粒剤又は散剤を適宜カプセルに充填して製造される。又、シロップ剤は、白糖、カルボキシセルロース等を含む水溶液にMMP阻害薬およびカテプシン阻害薬を溶解又は懸濁して製造され、軟カプセル剤は、脂質賦形剤、例えば、植物油、油性エマルジョン、グリコール等にMMP阻害薬およびカテプシン阻害薬を溶解または懸濁し、軟カプセルに充填して製造される。

【0022】非経口投与の剤形としては、注射剤の他、坐薬、陰坐薬等の坐剤、噴霧剤等の経鼻投与剤等が例示される。これらの製剤は常法によって製造可能であり、例えば注射剤は、MMP阻害薬およびカテプシン阻害薬を生理食塩液又は脂質賦形剤、例えば、植物油、油性エマルジョン、グリコール等に溶解又は乳化させ無菌的にアンプル又はバイアルに封入することによって製造される。本発明の薬剤の投与量は、その有効成分、即ち、MMP阻害薬およびカテプシン阻害薬からなる合剤の場合と両酵素に対して阻害活性を有する化合物の場合の他、剤型、患者の年齢、性別若しくは体重又は症状によっても異なるが、一般には、有効成分であるMMP阻害薬およびカテプシン阻害薬について、それぞれ0.1～500mg/kg体重/日、好ましくは1～200mg/kg体重/日が適量であり、両阻害薬を1日1回または2～4回に分けて投与する。本発明化合物の場合は、単独でMMPおよびカテプシンに対して阻害効果を発揮するので、両酵素に対する阻害効果によっても異なるが、0.1～500mg/kg体重/日、好ましくは1～200mg/kg体重/日が適量であり、これを1日1回または2～4回に分けて投与する。

【0023】

【発明の効果】MMP阻害薬とカテプシン阻害薬は、マウスを用いた実験においてそれぞれ単独で骨吸収抑制効果を示すが、両阻害薬を併用することにより骨吸収抑制の相加効果が認められ(試験例1参照)、併用することによる毒性は認められない。また、本発明化合物は単独

でMMPおよびカテプシンの両酵素に対して阻害効果を有する（試験例2参照）。従って、MMP阻害薬とカテプシン阻害薬の両成分を有効成分とする薬剤および本発明化合物を有効成分とする薬剤はいずれも結合組織疾患の予防又は治療薬として有用である。以下に試験例を示して本発明の薬剤および化合物の作用を説明する。

<試験例1>骨吸収抑制効果

Ca欠乏飼料による飼育を継続すると、不足するCaを補うために骨コラーゲン分解が促進され、骨量減少が惹起される（実験的骨粗鬆症モデル）。その結果、増加する尿中ヒドロキシプロリン排泄量に対する抑制効果を試験した。

供試化合物

公知化合物X：[4-（N-ヒドロキシアミノ）-2

（R）-イソブチル-3（S）-メチルサクシニル]-L-フェニルグリシン-N-メチルアミド（特開平7-101925号）

公知化合物Y：L-trans-エポキシサクシニル-ロイシルアミド（4-グアニジノ）ブタン（E-64；特開昭55-153778号）

試験方法

4週齢のddY系雄性マウスを一群5匹とし、無処置群以外をCa欠乏飼料（オリエンタル酵母（株）；カルシウム0.0105～0.012%、リン0.62%）で飼育を始めてから3日目に各群に対して表1の通り供試化合物および/または偽薬を投与し、一晚採尿を行った。

【0024】

【表1】

群	薬物投与	
	MMP阻害薬	カテプシン阻害薬
無処置群	0.5%CMC p.o.	生理食塩液 i.p.
対照群	0.5%CMC p.o.	生理食塩液 i.p.
化合物X投与群	化合物X 100mg/kg, p.o.	生理食塩液 i.p.
化合物Y投与群	0.5%CMC p.o.	化合物Y 100mg/kg, i.p.
化合物X、Y併用群	化合物X 100mg/kg, p.o.	化合物Y 100mg/kg, i.p.

p.o.：経口投与、i.p.：腹腔内投与

【0025】以下の方法により、尿量、クレアチニンおよびヒドロキシプロリンを定量して、尿中ヒドロキシプロリン量を対クレアチニン比として算出し、チューキー法により各群間の有意性を検定した。クレアチニンの定量にはクレアチニンテスト（和光純薬）を用いた。ヒドロキシプロリンは尿を6N塩酸加水分解後、高速液体クロマトグラフ装置でイオン交換カラム（日立ゲル#2619）を用いて分離し、o-フタルアルデヒドと反応させてヒドロキシプロリン誘導体とした後、蛍光光度計を用いて測定した。

試験結果

図1に示した。

【0026】化合物Xおよび化合物Yはそれぞれ単独で、増加したヒドロキシプロリン排泄量を抑制するが、両化合物を併用することによって更にヒドロキシプロリン排泄量を抑制することが明らかである。

<試験例2>MMPおよびカテプシン阻害効果

MMP-1およびカテプシンB、同Lに対する阻害効果を試験した。

1. 供試化合物

本発明化合物A…[4-（N-ヒドロキシアミノ）-2R-イソブチルサクシニル]-L-フェニルアラニル-L-アラニナル

本発明化合物B…[4-（N-ヒドロキシアミノ）-2R-イソブチルサクシニル]-L-ロイシル-L-アラ

ニナル

本発明化合物C…[4-（N-ヒドロキシアミノ）-2R-イソブチルサクシニル]-L-フェニルアラニル-L-ロイシナル

本発明化合物D…[4-（N-ヒドロキシアミノ）-2R-イソブチルサクシニル]-L-フェニルアラニルアラニル〔（2,6-ジクロロベンゾイル）オキシ〕メチルケトン

対照化合物 公知化合物X、公知化合物Y（試験例1参照）

2. 試験方法

MMP-1阻害の測定方法は以下の通りである。MMP-1は特開平3-103178号記載の方法により得られ精製したものを用いた。供試化合物を測定用緩衝液

（0.2M食塩、5mM塩化カルシウム、0.05容量%ブリッジ-35（ポリオキシエチレン ラウリルエーテル）および0.02容量%アジ化ナトリウムを含有する50mMトリス塩酸緩衝液、pH7.5）に溶解した液と既知量のMMP-1溶液とを混合し、フルオレッセイニンソチオシアネートで標識されたI型コラーゲン（コスモバイオ社製）を基質として用い、永井らの方法（Japanese Journal of Inflammation, 4巻, 123頁, 1984年参照）に準じMMP-1活性（A）を測定した。一方、供試化合物を加えないで同様の方法によりMMP-1活性（B）を測定し、下式

$$\text{阻害率 (\%)} = (1 - A/B) \times 100$$

により阻害率を求め、供試化合物の濃度と阻害率との関係から IC_{50} 値を求めた。カテプシンBおよびLの測定方法は以下の通りである。1 mMエチレンジアミン四酢酸、2 mMジチオスレイトールおよび0.05%容量%ブリッジ-35 (ポリオキシエチレン ラウリルエーテル) を含む100 mM酢酸緩衝液 (pH 5.5) 中で合成基質 (カルボベンゾキシフェニルアラニルアルギニル-7-アミド-4-メチルクマリン) とカテプシンB (ヒト肝由来; コスモバイオ社より購入) あるいはカテプシンL (ヒト腎由来; コスモバイオ社より購入) を

30℃で10分間反応させた。モノクロ酢酸を含む酢酸緩衝液 (pH 5.5) を加えて反応を停止させ、上清中の蛍光強度 (励起波長 $E_x = 375 \text{ nm}$ 、蛍光測定波長 $E_m = 445 \text{ nm}$) から酵素活性を測定し、上記MMP-1と同様にして IC_{50} 値を求めた。

(2) 試験結果

MMP-1とカテプシンBおよび同Lのそれぞれの阻害活性の測定結果 (IC_{50}) を表2に示す。

【0027】

【表2】

供試化合物	IC_{50} (nM)		
	MMP-1	カテプシンB	カテプシンL
本発明化合物A	25	93	15
本発明化合物B	47	230	23
本発明化合物C	1400	23	7
本発明化合物D	38	48	7
公知化合物X	3.0	>10000	—
公知化合物Y	>10000	25	—

【0028】

【実施例】以下に実施例および参考例を挙げて本発明を更に詳細に説明する。

参考例1

[4-(N-ベンジルオキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-フェニルアラニル-L-アラニル-N-メチル-N-メトキシアミド [一般式 (I V) において R^1 がイソブチル基、 R^2 がベンジル基、 R^3 がメチル基である化合物] の製造

(1) N-ベンジルオキシカルボニル-L-フェニルアラニル-L-アラニン-N-メチル-N-メトキシアミド [一般式 (V I I) において R^2 がベンジル基、 R^3 がメチル基である化合物] ; N-ベンジルオキシカルボニル-L-フェニルアラニル-L-アラニン 1.7 g に DMF 10 ml を溶解し、WSC 890 mg、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール-水合物 (以下、HOBt と略記する。) 630 mg、N,O-ジメチルヒドロキシルアミン・塩酸塩 450 mg、トリエチルアミン 470 mg を加えて、終夜室温で攪拌した。希塩酸を加えて酸性にした後、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、炭酸水素ナトリウム水溶液、水、飽和食塩水で洗浄した後、硫酸マグネシウムで乾燥した。硫酸マグネシウムを除去した後、溶媒を留去して得られる残渣を酢酸エチルから再結晶を行い、標記化合物 1.0 g を無色固体として得た。

【0029】 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ ; 1.23 (3H, d, J=7.0 Hz), 2.68 (1H, dd, J=11.2 Hz, 13.6 Hz), 3.00 (1H, dd, J=3.3 Hz, 13.6 Hz), 3.12 (3H, s), 3.74 (3H, s), 4.24-4.35 (1H, m), 4.68-4.80 (1H, m), 4.93 (2H, s), 7.15-7.36 (10H, m), 7.44 (1H, d, J=8.8 Hz), 8.29 (1H, d, J=7.5 Hz).

(2) [4-(N-ベンジルオキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-フェニルアラニル-L-アラニン-N-メチル-N-メトキシアミド; N-ベンジルオキシカルボニル-L-フェニルアラニル-L-アラニル-N-メチル-N-メトキシアミドにメタノール 15 ml を加え、10% Pd-C 100 mg を用いて水素雰囲気下、1.5 時間攪拌した。Pd-C を除去後、溶媒を留去して得られる残渣に DMF 5 ml を加え、4-(N-ベンジルオキシアミノ)-2(R)-イソブチルコハク酸 (特開平 101925 に従い製造した。) 440 mg、WSC 305 mg を加えて終夜室温で攪拌した。希塩酸を加えて酸性にした後、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、炭酸水素ナトリウム水溶液、水、飽和食塩水で洗浄した後、硫酸マグネシウムで洗浄した。硫酸マグネシウムを除去した後、溶媒を留去することにより標記化合物 0.29 g を無色固体として得た。

【0030】 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ ; 0.73 (3H, d, J=6.2 Hz), 0.79 (3H, d, J=6.2 Hz), 0.80-1.00 (1H, m), 1.20 (3H, d, J=7.0 Hz), 1.26-1.40 (2H, m), 1.83-1.90 (2H, m), 2.60-2.70 (1H, m), 2.78 (1H, dd, J=10.5 Hz, 13.9 Hz), 3.05 (1H, dd, J=4.0 Hz, 13.9 Hz), 3.11 (3H, s), 3.72 (3H, s), 4.48-4.57 (1H, m), 4.68-4.78 (1H, m), 4.74 (2H, s), 7.10-7.28 (5H, m), 7.37 (5H, s), 8.04 (1H, d, J=7.2 Hz), 8.10 (1H, d, J=8.4 Hz), 10.94 (1H, s).

参考例2

[4-(N-ベンジルオキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-ロイシル-L-アラニル-N-メチル-N-メトキシアミド [一般式 (I V) において R^1 がイソブチル基、 R^2 がイソブチル基、 R^3 がメチ

ル基である化合物]の製造

N-ベンジルオキシカルボニル-L-ロイシル-L-アラニン-N-メチル-N-メトキシアミド [一般式 (V I I) においてR²がイソブチル基、R³がメチル基である化合物] 1.0 gから参考例1に従って反応を行い、標記化合物0.5 gを無色固体として得た。

【0031】¹H-NMR (DMSO-d₆) δ; 0.80 (6H, d, J=6.4 Hz), 0.85 (6H, d, J=6.4 Hz), 0.98-1.10 (1H, m), 1.17 (3H, d, J=7.0 Hz), 1.35-1.52 (4H, m), 1.56-1.70 (1H, m), 1.99 (1H, d, J=7.0 Hz, 14.4 Hz), 2.14 (1H, dd, J=7.4 Hz, 14.4 Hz), 2.70-2.80 (1H, m), 3.10 (3H, s), 3.71 (3H, s), 4.24-4.34 (1H, m), 4.63-4.71 (1H, m), 4.73 (1H, d, J=11.0 Hz), 4.77 (1H, d, J=11.0 Hz), 7.32-7.40 (5H, m), 7.83 (1H, d, J=7.4 Hz), 8.01 (1H, d, J=8.3 Hz), 11.00 (1H, s).

参考例3

[4-(N-ベンジルオキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-フェニルアラニル-L-グリシル-N-メチル-N-メトキシアミド [一般式 (I V) においてR¹がイソブチル基、R²がベンジル基、R³が水素原子である化合物]の製造

N-ベンジルオキシカルボニル-L-フェニルアラニル-L-グリシル-N-メチル-N-メトキシアミド [一般式 (V I I) においてR²がベンジル基、R³が水素原子である化合物] 0.92 gから参考例1に従い反応を行い、標記化合物485 mgを無色固体として得た。

【0032】¹H-NMR (DMSO-d₆) δ; 0.73 (3H, d, J=6.2 Hz), 0.78 (3H, d, J=6.2 Hz), 0.87-0.99 (1H, m), 1.22-1.40 (2H, m), 1.79-1.95 (2H, m), 2.60-2.70 (1H, m), 2.81 (1H, dd, J=10.2 Hz, 13.8 Hz), 3.03-3.13 (1H, m), 3.10 (3H, m), 3.69 (3H, s), 3.93-4.11 (2H, m), 4.51-4.60 (1H, m), 4.73 (2H, s), 7.11-7.29 (5H, m), 7.37 (5H, s), 8.04 (1H, t, J=5.5 Hz), 8.13 (1H, d, J=8.5 Hz), 10.95 (1H, s).

参考例4

[4-(N-ベンジルオキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-フェニルアラニル-L-アラニル [(2,6-ジクロロベンゾイル)オキシ]メチルケトン [一般式 (X I) においてR¹がイソブチル基、R²がベンジル基、R³がメチル基、Arが2,6-ジクロロフェニル基である化合物]の製造

(1) [4-(N-ベンジルオキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-フェニルアラニル-L-アラニン エチルエステル [一般式 (X I V) においてR¹がイソブチル基、R²がベンジル基、R³がメチル基である化合物]の製造

N-ベンジルオキシカルボニル-L-フェニルアラニル-L-アラニン エチルエステル 5.0 gにメタノール 50 ml、THF 50 mlの混合溶媒を加えて、10% Pd-C 0.5 gを用いて水素雰囲気下撹拌した。Pd-Cを除去後、溶媒を留去して得られる残渣にDMF 30 ml、4-(N-ベンジルオキシアミノ)-2R-

イソブチルコハク酸 3.5 g、WSC 2.4 gを加えて、終夜室温で撹拌した。希塩酸を加えて酸性にした後、酢酸エチルとTHFの混合溶媒で抽出した。有機層を水、炭酸カリウム水溶液、水、飽和食塩水で洗浄した後、硫酸マグネシウムで乾燥した。硫酸マグネシウムを除去後、溶媒を留去することにより標記化合物5.0 gを無色固体として得た。

【0033】¹H-NMR (CDCl₃) δ; 0.84 (6H, t, J=6.2 Hz), 1.26 (3H, t, J=7.2 Hz), 1.32 (3H, d, J=7.2 Hz), 1.10-1.30 (1H, m), 1.40-1.60 (2H, m), 2.10-2.30 (1H, m), 2.65-2.80 (1H, m), 3.09 (2H, d, J=7.0 Hz), 4.15 (2H, q, J=7.2 Hz), 4.39-4.52 (1H, m), 4.57-4.68 (1H, m), 4.86 (2H, s), 6.43 (1H, d, J=7.9 Hz), 6.51 (1H, d, J=5.7 Hz), 7.16-7.40 (10H, m), 8.48 (1H, s).

【0034】(2) [4-(N-ベンジルオキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-フェニルアラニル-L-アラニル プロモメチルケトン [一般式 (X) においてR¹がイソブチル基、R²がベンジル基、R³がメチル基である化合物]; [4-(N-ベンジルオキシアミノ)-2R-イソブチルサクシニル]-L-フェニルアラニル-L-アラニン エチルエステル 1.0 gにジオキサン 10 mlを加え、1N水酸化ナトリウム水溶液 5 mlを加えて3時間室温で撹拌した。希塩酸を加えて酸性にした後、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄した後、硫酸マグネシウムで乾燥した。硫酸マグネシウムを除去後、溶媒を留去して得られる残渣にTHF 12 ml、トリエチルアミン 220 mgを加えた。0℃でクロロ炭酸エチル 240 mgを加えて5分間撹拌した。過剰のジアゾメタン/エーテル溶液を加えた5分後に2.5%臭化水素酢酸溶液を加えて30分間撹拌した。水を加えた後、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄した後、硫酸マグネシウムで乾燥した。硫酸マグネシウムを除去後、溶媒を留去することにより標記化合物0.48 gを得た。

【0035】¹H-NMR (DMSO-d₆) δ; 0.73 (3H, d, J=6.2 Hz), 0.79 (3H, d, J=6.2 Hz), 0.90-1.02 (1H, m), 1.16 (3H, d, J=7.0 Hz), 1.25-1.40 (2H, m), 1.90 (1H, dd, J=7.7 Hz, 14.4 Hz), 2.02 (1H, dd, J=7.1 Hz, 14.4 Hz), 2.60-2.70 (1H, m), 2.85 (1H, dd, J=9.4 Hz, 13.9 Hz), 3.03 (1H, dd, J=5.8 Hz, 13.9 Hz), 4.25 (2H, s), 4.30-4.37 (1H, m), 4.42-4.51 (1H, m), 4.74 (2H, s), 7.13-7.30 (5H, m), 7.37 (5H, s), 8.25 (1H, d, J=7.8 Hz), 8.49 (1H, d, J=6.9 Hz), 11.01 (1H, s).

(3) [4-(N-ベンジルオキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-フェニルアラニル-L-アラニル [(2,6-ジクロロベンゾイル)オキシ]メチルケトンの製造; [4-(N-ベンジルオキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-フェニルアラニル-L-アラニル プロモメチルケトン 0.48 gをDMF 10 mlに溶解し、フッ化カリウム 150

mg、2, 6-ジクロロ安息香酸190mgを加えて、終夜室温で攪拌した。酢酸エチルとTHFを加えた後、炭酸カリウム水溶液、水、希塩酸、水、飽和食塩水で洗浄した後、硫酸マグネシウムで乾燥した。硫酸マグネシウムを除去後、溶媒を留去することにより標記化合物0.34gを無色固体として得た。

【0036】 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ ; 0.72(3H, d, $J=6.2$ Hz), 0.79(3H, d, $J=6.2$ Hz), 0.90-1.02(1H, m), 1.21(3H, d, $J=7.1$ Hz), 1.25-1.40(2H, m), 1.91(1H, dd, $J=7.8$ Hz, 14.6 Hz), 2.04(1H, dd, $J=6.8$ Hz, 14.6 Hz), 2.60-2.70(1H, m), 2.86(1H, dd, $J=9.2$ Hz, 13.8 Hz), 3.06(1H, dd, $J=5.5$ Hz, 13.8 Hz), 4.33-4.43(1H, m), 4.46-4.57(1H, m), 4.74(2H, s), 4.91(1H, d, $J=17.1$ Hz), 5.00(1H, d, $J=17.1$ Hz), 7.12-7.29(5H, m), 7.37(5H, s), 7.53-7.64(3H, m), 8.26(1H, d, $J=8.0$ Hz), 8.48(1H, d, $J=7.1$ Hz), 11.02(1H, s)。

参考例5

[4-(N-ベンジルオキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-フェニルアラニル-グリシル[(2, 6-ジクロロベンゾイル)オキシ]メチルケトン[一般式(XI)において R^1 がイソブチル基、 R^2 がベンジル基、 R^3 が水素原子、Arが2, 6-ジクロロフェニル基である化合物]の製造

(1) [4-(N-ベンジルオキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-フェニルアラニル-グリシル エチルエステル[一般式(XIV)において R^1 がイソブチル基、 R^2 がベンジル基、 R^3 が水素原子である化合物]の製造

N-tert-ブトキシカルボニル-L-フェニルアラニル-グリシン エチルエステル 5.0gに90%トリフルオロ酢酸15mlを加えて、40分間氷冷下で攪拌した。トリフルオロ酢酸を留去した後、ジクロロメタンで抽出した。有機層を炭酸カリウム水溶液、水、飽和食塩水で洗浄した後、硫酸マグネシウムで乾燥した。硫酸マグネシウムを除去した後、溶媒を留去して得られる残渣にDMF30ml、4-(N-ベンジルオキシアミノ)-2(R)-イソブチルコハク酸4.0g、WSC2.8gを加え、終夜室温で攪拌した。希塩酸を加えてpHを酸性にした後、酢酸エチルとTHFの混合溶媒で抽出した。有機層を水、炭酸カリウム水溶液、水、飽和食塩水で洗浄した後、硫酸マグネシウムで乾燥した。硫酸マグネシウムを除去した後、溶媒を留去することにより標記化合物5.2gを得た。

【0037】(2) [4-(N-ベンジルオキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-フェニルアラニル-グリシル プロモメチルケトン[一般式(X)において R^1 がイソブチル基、 R^2 がベンジル基、 R^3 が水素原子である化合物]; [4-(N-ベンジルオキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-フェニルアラニル-L-アラニン エチルエステル 1.1gから参考例4の(2)に従って反応を

行い、標記化合物0.47gを得た。

(3) [4-(N-ベンジルオキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-フェニルアラニル-グリシル[(2, 6-ジクロロベンゾイル)オキシ]メチルケトンの製造; [4-(N-ベンジルオキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-フェニルアラニル-グリシル プロモメチルケトン0.47gから参考例4の(3)に従って反応を行い、標記化合物0.13gを得た。

【0038】 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ ; 0.73(3H, d, $J=6.2$ Hz), 0.79(3H, d, $J=6.2$ Hz), 0.89-1.02(1H, m), 1.23-1.40(2H, m), 1.83-2.02(2H, m), 2.62-2.70(1H, m), 2.86(1H, dd, $J=9.7$ Hz, 13.9 Hz), 3.07(1H, dd, $J=6$ Hz, 13.9 Hz), 4.07(2H, d, $J=5.3$ Hz), 4.50-4.60(1H, m), 4.74(2H, s), 5.10(2H, s), 7.12-7.28(5H, m), 7.37(5H, m), 7.53-7.64(3H, m), 8.23(1H, d, $J=8.2$ Hz), 8.35(1H, t, $J=5.3$ Hz), 10.98(1H, s)。

参考例6

[4-(N-ベンジルオキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-1-ナフチルアラニル-グリシル[(2, 6-ジクロロベンゾイル)オキシ]メチルケトン[一般式(XI)において R^1 がイソブチル基、 R^2 が1-ナフチルメチル基、 R^3 が水素原子、Arが2, 6-ジクロロフェニル基である化合物]の製造

N-tert-ブトキシカルボニル-L-1-ナフチルアラニル-グリシン エチルエステル 1.65gから参考例5に従って反応を行い、標記化合物0.48gを得た。

【0039】 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ ; 0.72(3H, d, $J=6.2$ Hz), 0.78(3H, d, $J=6.2$ Hz), 0.90-1.02(1H, m), 1.23-1.40(2H, m), 1.87(1H, dd, $J=1.4$ Hz, 13.7 Hz), 2.00(1H, dd, $J=6.8$ Hz, 13.7 Hz), 2.62-2.75(1H, m), 3.30-3.40(1H, m), 3.57(1H, dd, $J=5.2$ Hz, 14.2 Hz), 4.05(2H, s), 4.62-4.72(1H, m), 4.74(2H, s), 5.11(2H, s), 7.30-7.40(8H, m), 7.48-7.65(5H, m), 7.73-7.80(1H, m), 7.90(1H, d, $J=7.7$ Hz), 8.20(1H, d, $J=7.9$ Hz), 8.33-8.40(1H, m), 11.00(1H, s)。

参考例7

[4-(N-ベンジルオキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-フェニルアラニル-アスパラギル(tert-ブチル) [(2, 6-ジクロロベンゾイル)オキシ]メチルケトン[一般式(XI)において R^1 がイソブチル基、 R^2 がベンジル基、 R^3 がtert-ブトキシカルボニルメチル基、Arが2, 6-ジクロロフェニル基である化合物]の製造

N-ベンジルオキシカルボニル-L-フェニルアラニル-L-アスパラギル(tert-ブチル) エチルエステル 1.8gから参考例4に従って標記化合物0.12gを得た。

【0040】 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ ; 0.72(3H, d, $J=6.2$ Hz), 0.78(3H, d, $J=6.2$ Hz), 0.90-1.00(1H, m), 1.30-1.40(2H, m), 1.38(9H, s), 1.90(1H, dd, $J=8.3$ Hz, 14.6 Hz), 2.01(1H, dd, $J=6.9$ Hz, 14.6 Hz), 2.40-2.50(1H, m), 2.62-2.72(1H,

m), 2.73(1H, m), 2.86(1H, dd, J=9.4Hz, 13.9Hz), 3.02(1H, d, J=5.8Hz, 13.9Hz), 4.48-4.56(1H, m), 4.60-4.67(1H, m), 4.74(2H, s), 4.97(2H, s), 7.10-7.28(5H, m), 7.38(5H, s), 7.52-7.62(3H, m), 8.30(1H, d, J=7.8Hz), 8.69(1H, d, J=7.9Hz), 11.01(1H, s).

参考例 8

[4-(N-ベンジルオキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-フェニルアラニル-グリシル [ペンタフルオロベンゾイルオキシ] メチルケトン [一般式 (XI) において R¹がイソブチル基、R²がベンジル基、R³が水素原子、Ar がペンタフルオロフェニル基である化合物] の製造

[4-(N-ベンジルオキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-フェニルアラニル-グリシル プロモメチルケトン (参考例 5 (2) の化合物) 0.29 g を DMF 3 ml に溶解し、フッ化カリウム 90 mg、ペンタフルオロ安息香酸 140 mg を加えて、終夜室温で攪拌した。希塩酸を加えた後、酢酸エチルで抽出した。有機層を炭酸カリウム水溶液、水、飽和食塩水で洗浄した後、硫酸マグネシウムで乾燥した。硫酸マグネシウムを除去した後、溶媒を留去して得られる残渣を TLC 上 (展開液; クロロホルム/メタノール=20/1) で精製することにより標記化合物 0.12 g を得た。

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ; 0.73(3H, d, J=6.3Hz), 0.78(3H, d, J=6.3Hz), 0.88-1.00(1H, m), 1.22-1.43(2H, m), 1.85-2.02(2H, m), 2.61-2.69(1H, m), 2.88(1H, dd, J=10.0Hz, 13.9Hz), 3.10(1H, dd, J=4.8Hz, 13.9Hz), 4.05(2H, d, J=5.4Hz), 4.47-4.57(1H, m), 4.74(2H, s), 5.15(2H, s), 7.15-7.28(5H, m), 7.30-7.40(5H, m), 8.24(1H, d, J=8.1Hz), 8.42(1H, t, J=5.4Hz), 8.77(1H, s), 11.00(1H, s).

参考例 9

[4-(N-ベンジルオキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-フェニルアラニル-L-ロイシン-N-メチル-N-メトキシアミド [一般式 (I V) において R¹がイソブチル基、R²がベンジル基、R³がイソブチル基である化合物] の製造

N-ベンジルオキシカルボニル-L-フェニルアラニル-L-ロイシン-N-メチル-N-メトキシアミド [一般式 (V I I) において R²がベンジル基、R³がイソブチル基である化合物] 1.5 g から参考例 1 に従い反応を行い、標記化合物 0.3 g を無色固体として得た。

【0041】¹H-NMR (DMSO-d₆) δ; 0.73(3H, d, J=5.2Hz), 0.78(3H, d, J=5.2Hz), 0.86(6H, t, J=5.2Hz), 0.80-0.98(2H, m), 1.25-1.65(4H, m), 1.82-1.90(2H, m), 2.62-2.72(1H, m), 2.78(1H, dd, J=8.3Hz, 11.2Hz), 3.01(1H, dd, J=3.6Hz, 11.2Hz), 3.09(3H, s), 3.71(2H, s), 4.48-4.58(1H, m), 4.74(1H, m), 4.77-4.89(1H, m), 7.10-7.25(5H, m), 7.30-7.40(5H, m), 7.95(1H, d, J=7.0Hz), 8.11(1H, d, J=7.1Hz), 10.93(1H, s).

【0042】実施例 1

[4-(N-ヒドロキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-フェニルアラニル-L-アラニナル [一般式 (I a) において R¹がイソブチル基、R²がベンジル基、R³がメチル基である化合物] の製造

[4-(N-ベンジルオキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-フェニルアラニル-L-アラニン-N-メチル-N-メトキシアミド [一般式 (I V) において R¹がイソブチル基、R²がベンジル基、R³がメチル基である、参考例 1 の化合物] 500 mg に THF 10 ml を加えた後、-20℃で水素化リチウムアルミニウム 35 mg を加え 30 分間攪拌した。2N HCl 水にて酸性にした後、酢酸エチルを用いて抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄した後、硫酸マグネシウムで乾燥した。硫酸マグネシウムを除去し、溶媒を留去して得られる残渣をメタノール 10 ml に溶解した。10% Pd-C 70 mg を用いて水素雰囲気下、室温で 1.5 時間攪拌した。Pd-C を除去後、溶媒を留去して得られる固体を酢酸エチルで洗浄することにより標記化合物 51 mg を無色粉末として得た。

【0043】¹H-NMR (DMSO-d₆) δ; 0.73(3H, d, J=6.2Hz), 0.78(3H, d, J=6.2Hz), 0.90-1.30(1H, m), 1.12(3H, d, J=7.2Hz), 1.23-1.40(2H, m), 1.85-2.02(2H, m), 2.55-2.70(1H, m), 2.87(1H, dd, J=9.6Hz, 13.7Hz), 3.05(1H, dd, J=5.3Hz, 13.7Hz), 3.99-4.10(1H, m), 4.45-4.56(1H, m), 7.13-7.30(5H, m), 8.18(1H, d, J=8.2Hz), 8.40(1H, d, J=6.5Hz), 8.73(1H, s), 9.25(1H, s), 10.38(1H, s).

実施例 2

[4-(N-ヒドロキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-ロイシル-L-アラニナル [一般式 (I a) において R¹がイソブチル基、R²がイソブチル基、R³がメチル基である化合物] の製造

[4-(N-ベンジルオキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-ロイシル-L-アラニン-N-メチル-N-メトキシアミド [一般式 (I V) において R¹がイソブチル基、R²がイソブチル基、R³がメチル基である、参考例 2 の化合物] 500 mg から実施例 1 の製造と同様に反応を行い標記化合物 84 mg を無色粉末として得た。

【0044】¹H-NMR (DMSO-d₆) δ; 0.75-0.92(12H, m), 0.90-1.10(2H, m), 1.15(3H, d, J=7.2Hz), 1.35-1.70(4H, m), 1.90(1H, dd, J=1.5Hz, 14.3Hz), 2.16(1H, dd, J=7.0Hz, 14.3Hz), 2.63-2.77(1H, m), 4.00-4.10(1H, m), 4.20-4.33(1H, m), 8.04(1H, d, J=7.9Hz), 8.28(1H, d, J=6.6Hz), 8.70(1H, s), 9.34(1H, s), 10.39(1H, s).

実施例 3

[4-(N-ヒドロキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-フェニルアラニル-L-ロイシナル [一般式 (I a) において R¹がイソブチル基、R²がベンジル基、R³がイソブチル基である化合物] の製

造

[4-(N-ベンジルオキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-フェニルアラニル-L-ロイシン-N-メチル-N-メトキシアミド [一般式 (I V) においてR¹がイソブチル基、R²がベンジル基、R³がイソブチル基である、参考例9の化合物] 500mgから実施例1の製造と同様に反応を行い標記化合物51mgを無色粉末として得た。

【0045】¹H-NMR (DMSO-d₆) δ; 0.70-0.90(12H, m), 0.90-1.02(2H, m), 1.22-1.62(4H, m), 1.80-2.00(2H, m), 2.60-2.70(1H, m), 2.82-2.92(1H, m), 2.96-3.10(1H, m), 4.00-4.12(1H, m), 4.50-4.60(1H, m), 7.13-7.30(5H, m), 8.22(1H, d, J=8.3Hz), 8.31(1H, d, J=7.4Hz), 8.72(1H, s), 9.22(1H, s), 10.37(1H, s).

実施例4

[4-(N-ヒドロキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-フェニルアラニル-L-グリシナル [一般式 (I a) においてR¹がイソブチル基、R²がベンジル基、R³が水素原子である化合物] の製造

[4-(N-ベンジルオキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-フェニルアラニル-L-グリシン-N-メチル-N-メトキシアミド [一般式 (I V) においてR¹がイソブチル基、R²がベンジル基、R³が水素原子である、参考例3の化合物] 325mgから実施例1の製造と同様に反応を行い標記化合物73mgを無色粉末として得た。

【0046】¹H-NMR (DMSO-d₆) δ; 0.73(3H, d, J=6.3Hz), 0.77(3H, d, J=6.3Hz), 0.90-1.12(1H, m), 1.22-1.40(2H, m), 1.83-2.01(2H, m), 2.55-2.70(1H, m), 2.86(1H, dd, J=10.0Hz, 13.8Hz), 3.08(1H, dd, 4.9Hz, 13.8Hz), 3.78-3.93(2H, m), 4.47-4.57(1H, m), 7.10-7.30(5H, m), 8.18(1H, d, J=8.2Hz), 8.40(1H, t, J=5.4Hz), 8.75(1H, bs), 9.35(1H, s), 10.40(1H, bs).

【0047】実施例5

[4-(N-ヒドロキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-フェニルアラニル-L-アラニル [(2, 6-ジクロロベンゾイル) オキシ] メチルケトン [一般式 (I b) においてR¹がイソブチル基、R²がベンジル基、R³がメチル基、Arが2, 6-ジクロロフェニル基である化合物] の製造

[4-(N-ベンジルオキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-フェニルアラニン-L-アラニル [(2, 6-ジクロロベンゾイル) オキシ] メチルケトン [一般式 (X I) においてR¹がイソブチル基、R²がベンジル基、R³がメチル基、Arが2, 6-ジクロロフェニル基である化合物; 参考例4] 300mgをメタノール10ml、THF5mlに溶解し、10% Pd-C 100mgを用いて水素雰囲気下、2時間攪拌した。Pd-Cを除去後、溶媒を留去して得られる残渣をHPLCで分離精製することにより、下記条件で溶出

される標記化合物130mgを無色固体として得た。

【0048】HPLC条件

カラム; YMC-Pack ODS-A A-312 150×6.0mm I.D.

移動層; 0.05%トリフルオロ酢酸水/アセトニトリル=3/2

流速; 1.0ml/分

溶出時間; 10分

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ; 0.73(3H, d, J=6.2Hz), 0.78(3H, d, J=6.2Hz), 0.91-1.03(1H, m), 1.20(3H, d, J=7.1Hz), 1.25-1.42(2H, m), 1.86-2.04(2H, m), 2.60-2.72(1H, m), 2.86(1H, d, J=8.9Hz, 13.8Hz), 3.06(1H, dd, J=6.2Hz, 13.8Hz), 4.31-4.41(1H, m), 4.45-4.57(1H, m), 4.91(1H, d, J=17.0Hz), 4.98(1H, d, J=17.0Hz), 7.13-7.30(5H, m), 7.52-7.64(3H, m), 8.25(1H, d, J=8.1Hz), 8.47(1H, d, J=7.1Hz), 8.74(1H, s), 10.39(1H, s).

実施例6

[4-(N-ヒドロキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-フェニルアラニル-L-グリシナル

[(2, 6-ジクロロベンゾイル) オキシ] メチルケトン [一般式 (I b) においてR¹がイソブチル基、R²がベンジル基、R³が水素原子、Arが2, 6-ジクロロフェニル基である化合物] の製造

[4-(N-ベンジルオキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-フェニルアラニン-L-グリシナル [(2, 6-ジクロロベンゾイル) オキシ] メチルケトン [一般式 (X I) においてR¹がイソブチル基、R²がベンジル基、R³が水素原子、Arが2, 6-ジクロロフェニル基である化合物; 参考例5] 130mgをメタノール15ml、THF5mlの混合溶媒に溶解し、10% Pd-C 75mgを用いて水素雰囲気下、2時間攪拌した。触媒を除去した後、溶媒を留去して得られる残渣をHPLCを用いて分離精製することにより、下記条件で溶出される標記化合物を10mg無色固体として得た。

【0049】HPLC条件

カラム; YMC-Pack ODS-A A-312 150×6.0mm I.D.

移動層; 0.05%トリフルオロ酢酸水/アセトニトリル=3/2

流速; 1.0ml/分

溶出時間; 18分

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ; 0.73(3H, d, J=6.3Hz), 0.78(3H, d, J=6.3Hz), 0.90-1.00(1H, m), 1.23-1.42(2H, m), 1.83-2.00(2H, m), 2.60-2.70(1H, m), 2.86(1H, dd, J=10.1Hz, 13.8Hz), 3.08(1H, dd, J=4.9Hz, 13.8Hz), 4.07(2H, d, J=5.4Hz), 4.49-4.59(1H, m), 5.11(2H, s), 7.14-7.30(5H, m), 7.54-7.66(3H, m), 8.23(1H, d, J=8.1Hz), 8.37(1H, t, J=5.4Hz), 10.40(1H, s).

実施例7

[4-(N-ヒドロキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル]-L-1-ナフチルアラニル-L-グリシナル

〔(2, 6-ジクロロベンゾイル) オキシ〕メチルケトン〔一般式 (I b) においてR¹がイソブチル基、R²が1-ナフチルメチル基、R³が水素原子、Arが2, 6-ジクロロフェニル基である化合物〕の製造

〔4- (N-ベンジルオキシアミノ) -2 R-イソブチルサクシニル〕-L-フェニルアラニル-グリシル

〔(2, 6-ジクロロベンゾイル) オキシ〕メチルケトン〔一般式 (X I) においてR¹がイソブチル基、R²が1-ナフチルメチル基、R³が水素原子、Arが2, 6-ジクロロフェニル基である化合物；参考例6〕70mgをメタノール10ml、THF 5mlの混合溶媒に溶解し、10% Pd-C 20mgを用いて水素雰囲気下、4.5時間攪拌した。Pd-Cを除去後、溶媒を留去して得られる残査をHPLCを用いて分離精製することにより下記条件で溶出される標記化合物8mgを無色固体として得た。

【0050】HPLC条件

カラム；YMC-Pack ODA-A A-312 150×6.0mm I.D.
移動層；0.05%トリフルオロ酢酸水/アセトニトリル=1/1

流速；1.0ml/分

溶出時間；14分

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ；0.72(3H, d, J=6.3Hz), 0.77(3H, d, J=6.3Hz), 0.90-1.02(1H, m), 1.22-1.40(2H, m), 1.87(1H, dd, J=1.7Hz, 13.9Hz), 1.99(1H, dd, J=6.8Hz, 13.9Hz), 2.60-2.70(1H, m), 3.35-3.45(1H, m), 3.61(1H, dd, J=4.7Hz, 14.0Hz), 4.05(2H, s), 4.60-4.70(1H, m), 5.12(2H, s), 7.35-7.44(2H, m), 7.50-7.66(5H, m), 7.75-7.81(1H, m), 7.92(1H, d, J=8.0Hz), 8.20(1H, d, J=8.2Hz), 8.33-8.43(1H, m), 10.4(1H, s).

【0051】実施例8

〔4- (N-ヒドロキシアミノ) -2 (R) -イソブチルサクシニル〕-L-フェニルアラニル-アスパラギル
〔(2, 6-ジクロロベンゾイル) オキシ〕メチルケトン〔一般式 (I b) においてR¹がイソブチル基、R²がベンジル基、R³がカルボキシメチル基、Arが2, 6-ジクロロフェニル基である化合物〕の製造

〔4- (N-ベンジルオキシアミノ) -2 (R) -イソブチルサクシニル〕-L-フェニルアラニル-アスパラギル (tert-ブチル) 〔(2, 6-ジクロロベンゾイル) オキシ〕メチルケトン〔一般式 (X I) においてR¹がイソブチル基、R²がベンジル基、R³がtert-ブトキシカルボニルメチル基、Arが2, 6-ジクロロフェニル基である化合物；参考例7〕0.12gに90%トリフルオロ酢酸水 5mlを加えて50分間室温で攪拌した。トリフルオロ酢酸を留去して得られる残査をクロロホルムで抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄した後、硫酸マグネシウムで乾燥した。硫酸マグネシウムを除去して得られる残査をメタノール10mlに溶解し、10% Pd-C 50mgを用いて水素雰囲気下、1

時間攪拌した。Pd-Cを除去後、溶媒を留去して得られる残査をHPLCを用いて分離精製することにより下記条件で溶出される標記化合物23mgを無色固体として得た。

【0052】HPLC条件

カラム；YMC-Pack ODS-A A-312 6.0×150mm I.D.

移動層；0.05%トリフルオロ酢酸水/アセトニトリル=3/2

流速；1.0ml/分

溶出時間；16分

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ；0.72(3H, d, J=6.2Hz), 0.78(3H, d, J=6.2Hz), 0.90-1.00(1H, m), 1.25-1.42(2H, m), 1.83-2.01(2H, m), 2.45-2.55(1H, m), 2.60-2.70(1H, m), 2.75(1H, m), 2.86(1H, dd, J=9.2Hz, 13.7Hz), 3.02(1H, dd, J=5.8Hz, 13.7Hz), 4.48-4.62(2H, m), 5.00(2H, s), 7.15-7.29(5H, m), 7.52-7.63(3H, m), 8.29(1H, d, J=7.9Hz), 8.65(1H, d, J=7.7Hz), 10.39(1H, s), 12.46(1H, s).

【0053】実施例9

〔4- (N-ヒドロキシアミノ) -2 (R) -イソブチルサクシニル〕-L-フェニルアラニル-グリシル〔ペンタフルオロベンゾイルオキシ〕メチルケトン〔一般式 (I b) においてR¹がイソブチル基、R²がベンジル基、R³が水素原子、Arがペンタフルオロフェニル基である化合物〕の製造

〔4- (N-ベンジルオキシアミノ) -2 (R) -イソブチルサクシニル〕-L-フェニルアラニル-グリシル〔ペンタフルオロベンゾイルオキシ〕メチルケトン〔一般式 (X I) においてR¹がイソブチル基、R²がベンジル基、R³が水素原子、Arがペンタフルオロフェニル基である化合物；参考例8〕0.12gをメタノール10mlに溶解し、10% Pd-C 50mgを用いて水素雰囲気下、1時間攪拌した。Pd-Cを除去後、溶媒を留去して得られる残査をHPLCを用いて分離精製することにより下記条件で溶出される標記化合物26mgを無色固体として得た。

【0054】HPLC条件

カラム；YMC-Pack ODS-A A-312、150×6.0mm I.D.

移動層；0.05%トリフルオロ酢酸水/アセトニトリル=1/1

流速；1.0ml/分

溶出時間；5.5分

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ；0.72(3H, d, J=6.3Hz), 0.77(3H, d, J=6.3Hz), 0.88-1.00(1H, m), 1.22-1.42(2H, m), 1.83-2.00(2H, m), 2.60-2.70(1H, m), 2.86(1H, dd, J=10.2Hz, 13.8Hz), 3.08(1H, dd, J=4.7Hz, 13.8Hz), 4.05(2H, d, J=5.4Hz), 4.47-4.57(1H, m), 5.15(2H, s), 7.15-7.28(5H, m), 8.24(1H, d, J=8.1Hz), 8.42(1H, t, J=5.4Hz), 8.77(1H, s), 10.39(1H, s).

【0055】実施例10

錠剤の製造

以下の通り、1錠中に〔4-（N-ヒドロキシアミノ）-2（R）-イソブチルサクシニル〕-L-フェニルアラニル-L-アラニナル（化合物A）100mgを含有する錠剤を得る。

【処方】

成分	配合量
主薬（化合物A）	100重量部
コーンスターチ	46重量部
微結晶セルロース	98重量部
ヒドロキシプロピルセルロース	2重量部
ステアリン酸マグネシウム	4重量部

【操作】主薬、コーンスターチ及び微結晶セルロースを混合し、これに水50重量部に溶解したヒドロキシプロピルセルロースを加えて充分練合する。この練合物を篩に通して顆粒上に造粒して乾燥した後、得られた顆粒にステアリン酸マグネシウムを混合し1錠250mgに打錠する。

【0056】実施例11

顆粒剤の製造

以下の通り、〔4-（N-ヒドロキシアミノ）-2（R）-イソブチルサクシニル〕-L-フェニルアラニル-L-アラニナル（化合物A）を含有する顆粒剤を得る。

【処方】

成分	配合量
主薬（化合物A）	200重量部
乳糖	185重量部
コーンスターチ	109重量部
ヒドロキシプロピルセルロース	6重量部

【操作】主薬、乳糖及びコーンスターチを混合し、これに水120重量部に溶解したヒドロキシプロピルセルロースを加えて充分練合する。この練合物を20メッシュの篩に通して造粒し、乾燥して整粒を行い、500mg中に主薬200mgを含有する顆粒剤を得る。

【0057】実施例12

カプセル剤の製造

以下の通り、1カプセル中に〔4-（N-ヒドロキシアミノ）-2（R）-イソブチルサクシニル〕-L-フェニルアラニル-L-アラニナル（化合物A）100mgを含有するカプセル剤を得る。

【処方】

成分	配合量
主薬（化合物A）	100重量部
乳糖	35重量部
コーンスターチ	60重量部
ステアリン酸マグネシウム	5重量部

【操作】上記の各成分を充分混合して、この混合物の200mg宛をカプセルに充填してカプセル剤を得る。

【0058】実施例13

注射剤の製造

〔4-（N-ヒドロキシアミノ）-2（R）-イソブチルサクシニル〕-L-フェニルアラニル-L-アラニナル0.5重量部およびソルビット5重量部の混合物に注射用蒸留水を加えて溶解し、100重量部とし、この水溶液をメンブランフィルターで濾過する。濾液を窒素置換したアンプルに5gずつ充填し、溶閉後、120℃で15分間滅菌処理して1アンプル中に〔4-（N-ヒドロキシアミノ）-2（R）-イソブチルサクシニル〕-L-フェニルアラニル-L-アラニナル25mgを含有する注射剤を得る。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1に、Ca欠乏飼料にて飼育したマウスの尿中ヒドロキシプロリン排泄量（対クレアチニン比）に対する、化合物X、Yをそれぞれ単独で投与及び併せて投与した場合の効果（試験例1）を示した。

【符号の説明】

棒グラフa、b、c、d、eはそれぞれ以下の群の尿中ヒドロキシプロリン排泄量（対クレアチニン比）を示す。

- a：無処置群
- b：対照群
- c：化合物X投与群
- d：化合物Y投与群
- e：化合物X、Y併用群

また、チューキー法により各群間の有意差検定を行い、結果を*で示した。

* $P < 0.01$

【図1】

